



Eur päisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

Bescheinigung      Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°

02016244.2

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,  
LA HAYE, LE  
17/03/03





Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.: 02016244.2  
Application no.: 02016244.2  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: 22/07/02  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Roche Diagnostics GmbH  
68305 Mannheim  
GERMANY  
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
4070 Basel  
SWITZERLAND  
Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase und Dextran, Verfahren zur Herstellung und Verwendung

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:	Tag:	Aktenzeichen:
State:	Date:	File no.
Pays:	Date:	Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

/

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BG/BE/CH/CY/CZ/DE/DK/EE/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:



22 Juli 2002

Case 21323 EP

**Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase und Dextran,  
Verfahren zur Herstellung und Verwendung.**

Gegenstand der Erfindung ist ein Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase und Dextran, ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugates und ihre Verwendung.

Alkalische Phosphatasen (AP, EC 3.1.3.1) gehören zu einer ubiquitär verbreiteten Familie dimerer Metalloenzyme, die unter alkalischen Bedingungen die Hydrolyse von Phosphatmonoestern unter Freisetzung von anorganischem Phosphat katalysieren (McComb et al. (1979), Alkaline Phosphatases, Plenum Press, New York). Im Menschen können vier Isoenzyme unterschieden werden: i) die Placenta-spezifische AP, ii) die Keimzellen-spezifische (Placental)-AP, iii) die Intestinal-AP und iv) die gewebeunspezifische AP (tns-AP) (Harris, H., Clin Chim Acta 186 (1990) 133-50). Die tns-AP wird am stärksten in der Leber (LAP), der Niere (KAP) und den Knochen (BAP) gebildet (Moss, D. W., Clin Chem 38 (1992) 2486-92) und ist die am häufigsten vertretene AP-Isoform im Serum (Mulivor, R. A., et al., J Lab Clin Med 105 (1985) 342-8). LAP, KAP und BAP unterscheiden sich aufgrund unterschiedlicher posttranslationaler O-Glykosilierungsmuster voneinander (Miura, M., et al., Ann Clin Biochem 31 (1994) 25-30), was sich auch in unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten niederschlägt (Nosjean, O., et al., Biochem J 321 (1997) 297-303) sind jedoch in ihrer Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch (Weiss, M. J., et al., J Biol Chem 263 (1988) 12002-10). Zudem wiesen Nosjean et al. nach, dass die N-Glykosilierung der tns-AP essentiell für die enzymatische Aktivität ist. Gewebsunspezifische AP ist demzufolge ein Gemisch von unterschiedlichen glycosilierten APs.

Das Gen für die humane tns-AP konnte bereits 1986 kloniert werden (Weiss, M. J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986) 7182-6). Es kodiert für ein aus 524 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer 17 Aminosäuren langen N-terminalen Signalsequenz sowie einer C-terminalen GPI-Anker-Sequenz, mit der das Protein in vivo auf der Außenseite der Plasmamembran verankert ist (Hooper, N. M., Clin Chim Acta 266 (1997) 3-12). Obwohl also die DNA-Sequenz der humanen tns-AP länger bekannt ist, wurde bislang lediglich über die Expression eines rekombinanten, biologisch aktiven Enzyms in eukaryotischen Zellen wie z. B. COS-1 (Fukushi, M., et al., Biochem Biophys Res Commun 246 (1998)

613-8) oder Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Oda, K., et al., J Biochem (Tokyo) 126 (1999) 694-9) berichtet.

Die heterologe Expression von Proteinen in Prokaryonten wie z. B. Escherichia coli ist eine häufig verwendete Technologie zur sicheren und kostengünstigen Herstellung rekombinanter Proteine. Die Expression eukaryontischer Proteine in Prokaryonten weist dabei zwei Charakteristika auf: i) Prokaryonten wie z. B. E. coli führen eine Reihe von für Eukaryonten typische posttranskriptionale Modifikationen wie beispielsweise Glykosilierungen nicht durch und ii) in Prokaryonten exprimierte eukaryotische Proteine liegen häufig in Form schwer löslicher, biologisch inaktiver Proteinaggregate (Inclusion Bodies, IBs) vor (Makrides, S. C., Microbiol Rev 60 (1996) 512-38, Balbas, P., Mol Biotechnol 19 (2001) 251-67). Letztere können mit bekannten Methoden (Lilie, H., et al., Curr Opin Biotechnol 9 (1998) 497-501) in eine enzymatisch aktive Form zurückgeführt werden. Dazu werden die IBs zunächst durch Zugabe eines chaotropen Agens wie z.B. Harnstoff in Lösung gebracht, und durch Dialyse oder durch Verdünnung in einem chaotrop-freien Puffer naturiert. Im Stand der Technik wird ein Verfahren zur Renaturierung einer Placenta-spezifischen alkalischen Phosphatase beschrieben (US 5,434,067).

Obwohl die physiologische Rolle der alkalischen Phosphatase weitgehend unbekannt ist, gehört die Bestimmung ihrer enzymatischen Aktivität zu den Routineuntersuchungen in der klinischen Diagnostik. Eine Veränderung der AP-Aktivität im Serum gilt als diagnostischer Marker für eine Vielzahl von klinischen Erscheinungsbildern, wie z.B. Hypo- oder Hyperphosphatasiasis (Silve, C., Curr Opin Rheumatol 6 (1994) 336-9), Erkrankungen der Leber, der Gallenwege sowie Sepsis (Maldonado, O., et al., J Clin Gastroenterol 27 (1998) 342-5, Wiwanitkit, V., BMC Fam Pract 2 (2001) 2) oder auch Knochenerkrankungen (Romagnoli, E., et al., Clin Chem Lab Med 36 (1998) 163-8). Im Serum liegt ein heterogenes Gemisch der verschiedenen Formen der AP vor. Wie bereits angeführt, variiert auch das Verhältnis von LAP, KAP und BAP, die zusammen die tns-AP bilden, von Patient zu Patient, da das Verhältnis der einzelnen Formen der AP im Serum abhängig ist von Art und Schwere der individuellen Erkrankung der Patienten.

Aus diesem Grund ist es schwierig, geeignete Referenz- bzw. Standardproben zur Verfügung zu stellen. Üblicherweise werden Serum pools aus Seren von Patienten mit AP Normalwerten und erhöhten AP-Werten verwendet, aber auch Präparationen normaler LAP oder BAP kommen zum Einsatz. Die für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase

- 5 in humanem Serum oder Plasma verwendeten Referenzproben stammen auch aus tierischen Quellen wie Rind oder Schwein, aus humanen Zelllinien oder der humanen Placenta. Dies birgt verschiedene Nachteile in sich: Die Isolierung von Enzymen aus tierischen oder humanen Geweben ist mit einer hohen Infektionsgefahr (HIV, BSE) verbunden und technisch sehr aufwendig. Aufgrund fehlender Alternativen empfiehlt die
- 10 International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) z. Zt. die Verwendung einer aus Schweinenieren isolierten tns-AP als Referenzenzym (Tietz, N. W., et al., J Clin Chem Clin Biochem 21 (1983) 731-48).

- 15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es eine Präparation einer AP zur Verfügung zu stellen, die als Referenz in der klinischen Diagnostik verwendet werden kann und reproduzierbar und einfach herzustellen ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Konjugat einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) und Dextran erhältlich durch Reaktion von unglykolyserter tns-AP mit aktiviertem Dextran in wässriger Lösung, abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung.

- 20 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass ein erfindungsgemäßes Konjugat enzymatisch aktiv ist, die Eigenschaften einer tns-AP besitzt und sich deshalb insbesondere als Standard in AP-Tests eignet. Darüber hinaus ist die gemessene AP Aktivität des erfindungsgemäßen Konjugates im Reagenz, welches von der IFCC empfohlen wird (Tietz et al., supra), nicht wesentlich von der Pufferkonzentration abhängig.

25 **IFCC Reagenz und Reaktionsbedingungen:**

Temperatur	$30 \pm 0.05^\circ\text{C}$
pH (30 °C)	$10.40 \pm 0.05$
2-Amino-2-methyl-1-propanol Puffer	$0.35 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
4-Nitrophenylphosphat	$10.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
Magnesiumacetat	$2.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Zinksulfat	1.0 mmol · l <sup>-1</sup>
N-Hydroxyethylethyldiamin-tri-essigsäure (HEDTA)	2.0 mmol · l <sup>-1</sup>
Volumen Fraktion der Probe	0.0196 (1:51)

Überraschenderweise werden im IFCC-Test gleiche Aktivitäten für den erfindungsgemäßen Standard im Pufferbereich von 0,35 - 0,90 mol/l gemessen. In den anderen Eigenschaften verhält sich der erfindungsgemäße Standard im IFCC-Test analog zu einem Kontrollserum.

5 Vergleichsversuche zeigen, dass dagegen ein Konjugat aus unglycosylierter tns-AP und Glukose (glukosyierte tns-AP) als Standard ungeeignet ist.

Unter einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) ist erfindungsgemäß eine alkalische Phosphatase zu verstehen, die in glycosylierter Form aus humaner Leber, Knochen oder Niere isoliert werden kann (EC 3.1.3.1). Die Nukleotidsequenz von tns-AP

10 ist beschrieben von Weiss et al., 1986 supra. Tns-APS aus Leber, Knochen und Niere unterscheiden sich gemäß Nosjean et al., supra lediglich in ihrer Glycosylierung, nicht jedoch in der Aminosäuresequenz.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zu Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats als unglycosyierte tns-AP eine tns-AP verwendet, die durch rekombinante

15 Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer prokaryonischen Zelle, vorzugsweise in E. coli und gegebenenfalls nach Naturierung, erhalten werden kann. Derartige Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in Prokaryonten sind aus dem Stand der Technik bekannt (vgl. Lilie et al., supra).

Es ist weiter bevorzugt, für das Konjugat ein Dextran mit einem mittleren

20 Molekulargewicht von 10 – 500 kDa zu verwenden. Wie sich gezeigt hat, hat allerdings das Molekulargewicht des verwendeten Dextrans nur einen sehr geringen Einfluß auf die erfindungsgemäßen Eigenschaften des Konjugates. Die Kopplung von Dextran an tns-AP kann nach bekannten Verfahren erfolgen. Dabei wird das Dextran zunächst aktiviert, vorzugsweise durch Periodatoxidation von Dextran, Cyanylierung mit CNBr oder

25 Aktivierung mit CDAP (1-Cyano-Dimethylaminopyridiniumtetrafluoroborat). Anschließend erfolgt die Kopplung durch Inkubation vorzugsweise bei Raumtemperatur (siehe z. B. Andersson, A., et al., Int J Cancer 47 (1991) 439-44; Holmberg, A. and Meurling, L., Bioconjug Chem 4 (1993) 570-3; Lovqvist, A., et al., Cancer Biother 8 (1993) 345-56; Olsson, P., et al., Int J Cancer 56 (1994) 529-37; Sjostrom, A., et al., Int J Cancer 70

30 (1997) 383-9). Nach Abstoppen der Reaktion, vorzugsweise mit einem Aminreagens, kann das Konjugat isoliert werden durch bekannte Reinigungsmethoden, wie z. B.

chromatographische Methoden. Mit diesem Verfahren wird Dextran an die unglycolysierte tns-AP in Zufallspositionen kovalent gebunden, wodurch ein heterogenes Gemisch von Konjugaten aus Dextran und tns-AP entsteht. Die erfindungsgemäße Eignung des Konjugates wird dadurch gewährleistet, dass zur Herstellung reproduzierbare Bedingungen

- 5 in Bezug auf Temperatur, Aktivierungsreagenz, Verhältnis Aktivierungsreagenz zu Dextran, Verhältnis unglycolysierter tns-AP zu aktiviertem Dextran, mittleres Molekulargewicht des Dextrans, Inkubationszeit und Abstoppreagenz eingehalten werden. Die erfindungsgemäß geeigneten Reaktionsbedingungen sind jedoch in einem weiten Bereich variabel und an sich unkritisch.
- 10 Vorzugsweise wird die Reaktion bei Raumtemperatur und über etwa eine Stunde durchgeführt. Als Aktivierungsreagenzien werden bevorzugt CDAP oder BrCN verwendet. Das molare Verhältnis Aktivierungsreagenz zu Dextran beträgt vorzugweise 1:2 bis 1:20.

Es ist bevorzugt, dass für die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugates aktivierte Dextran im Überschuß, vorzugsweise im molaren Verhältnis 1:2 bis 1:500, besonders bevorzugt 1:10 bis 1:500 (in Bezug auf die unglycosyierte tns-AP), eingesetzt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates durch Reaktion von unglycosylierter tns-AP mit aktiviertem Dextran durch Inkubation in wässriger Lösung, abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung. Vorzugsweise beträgt die Dauer der Inkubation etwa 1 Stunde. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt vorzugsweise durch Zugabe eines Aminoreagenzes wie beispielsweise Ethanolamid.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zur Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugates unglycosylierte tns-AP verwendet, die durch rekombinante Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer prokaryotischen Zelle erhalten wurde.

25 Besonders bevorzugt wird ein Dextran eines mittleren Molekulargewichts von 10 – 100 kDa verwendet, das Dextran mit CDAP aktiviert und für die genannte Reaktion unglycosylierte tns-AP und aktiviertes Dextran im molaren Verhältnis 1:10 bis 1:500 eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer unglycosylierter tns-AP zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus unglycosylierter tns-AP und 30 Dextran.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Konjugates als Standard in einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung der alkalischen Phosphatase. Solche Verfahren sind beispielsweise von Tietz et al., supra beschrieben.

5 Die folgenden Beispiele, Publikationen, das Sequenzprotokoll und die Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

**Beschreibung der Figuren:**

Figur 1 Restriktionskarte humane tns-AP

10 Figur 2 Plasmidkarte pBKShuap11

Figur 3 Restriktionskarte pelB-APN

Figur 4 Plasmidkarte pQ Epel BAP

Figur 5 Rückfaltungskinetik von unglycosylierter tns-AP

Figur 6 Elutionsprofil von dextranisierter tns-AP

15 Figur 7 Aktivitätsprofil von dextranisierter tns-AP (40 kDa)  
(x: Ergebnisse mit Kontrollserum; Δ: Ergebnisse mit erfindungsgemäßem Standard)

20 Figur 8 Aktivitätsprofil von dextranisierter tns-AP (10 kDa, 40 kDa, 60 kDa, 188 kDa, 400 kDa), controls: Kontrollseren (PNU, PPU)

Figur 9 Aktivitätsprofil von dextranisierter tns-AP (40 kDa) im Vergleich zu glucosylierter tns-AP, Kontrollseren (PNU, PPU) und nicht modifizierter, unglycosylierter tns-AP (Ab nativ)

**Beispiel 1**

**Klonierung des humanen tns-AP Gens**

Dieser Abschnitt beschreibt die Isolierung und Klonierung des Gens für die humane tns-AP sowie die Konstruktion eines zur Expression in Escherichia coli geeigneten Fusionsgens mit 5 einer PelB-Signalsequenz. Alle dazu verwendeten DNA-Amplifizierungs- und Klonierungstechniken sind dem Fachmann wohl vertraut und beschrieben (Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA).

Zunächst wurde aus einer humanen Leber-cDNA-Bank mittels der Oligonukleotide apNup 10 (SEQ ID NO: 1) und apCdw (SEQ ID NO: 2) die komplette Gensequenz für die humane tns-AP sowie die unmittelbar benachbarten 5'- und 3'-Bereiche mittels der sg. Polymerasekettenreaktion isoliert (SEQ ID NO: 3 und 4), Fig. 1). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verdaut und in einem mit den gleichen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor ligiert. Figur 2 zeigt das 15 resultierende Plasmid (pBKShuap11).

Die anschließende Konstruktion des zur Expression verwendeten Fusionsgens erfolgte in drei Schritten: [I] Es wurde ein synthetischer Genabschnitt via Gensynthese konstruiert, der einen PelB-Signalsequenz-kodierenden Bereich mit einem Teil des tns-AP -Gens kodierenden Bereichs (Positionen 102-503 aus SEQ ID NO: 3) fusionierte. Die Synthese 20 erfolgte in einer 3-stufigen PCR-Reaktion mittels acht (SEQ ID NO: 5-12) um 20 bp überlappenden Oligonukleotiden, wobei in der ersten Stufe Genabschnitte aus den Primerpaaren uppel/dwpel (Fragment 1), apn1\_up/apn1\_dw (Fragment 2), apn2\_up/apn2dw (Fragment 3) sowie apn3\_up/apn3\_dw (Fragment 4) hergestellt wurden. In der zweiten Stufe wurden die Fragmente 1 und 2 als Template zur Synthese des 25 Fragments 5, wobei die Oligonukleotide uppel und apn1\_dw als Primer dienten, sowie die Fragmente 3 und 4 als Template zur Herstellung des Fragments 6, wobei die Oligonukleotide apn2\_up und apn3\_dw als Primer dienten, verwendet. In der dritten Stufe wurden die Fragmente 5 und 6 als Template zur Synthese des finalen synthetischen Gens pelB-AP\_N (SEQ ID NO: 13, Fig. 3) eingesetzt, wobei die Oligonukleotide uppel und

apn3\_dw als Primer verwendet wurden. Auf jeder der drei Stufen der Synthese wurden identische Mengen an Primer bzw. Fragmenten zur Synthese eingesetzt.

[II] Mittels der Oligonukleotide mhuapQEup (SEQ ID NO: 14) und mhuapQEdw (SEQ ID NO: 15) als Primer wurde in einer Polymerasekettenreaktion mit dem Plasmid gemäß 5 Figure 2 als Template ein Abschnitt des htns-AP-Gens vervielfältigt (bp 102-1561 von SEQ ID NO: 3). Das Oligonukleotid mhuapQEdw entfernt die für die letzten 20 Aminosäuren der htns-AP kodierende Sequenz und fügt dem 3'-Ende des Gens die Sequenz AGATCTTAGTAAGGATCCAGAT (SEQ ID NO: 18) hinzu.

[III] Das synthetische Gen pelB-AP\_N wurde mit den Restriktionendonukleasen EcoRI 10 und BstEII, der aus Schritt [II] stammende Genabschnitt mit den Restriktionendonukleasen BstEII und BamHI verdaut und mit dem, mit den Restriktionendonukleasen EcoRI und BamHI verdauten Plasmid pQE60 (Qiagen, Hilden, Deutschland) ligiert. Für die Ligationsreaktion wurden gleiche Mengen der verwendeten DNA-Fragment eingesetzt. Das resultierende Fusionsgen wurde als pelB-tns-AP-deltaGPI 15 (SEQ ID NO: 16 und 17), das entstandene Expressionsplasmid, in dem die Expression des pelB-tns-AP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T5-Promotors steht, mit pQEpelBAP (Fig. 4) bezeichnet.

#### Beispiel 2

#### Expression des pelB-tns-AP Gens in Escherichia coli

20 Mit dem Expressionsplasmid aus Beispiel 1 pQEpelBAP wurde E. coli K12 transformiert und der daraus resultierende Stamm in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Die Expression des pelB-tns-AP-Fusionsproteins erfolgt nach Zugabe von IPTG in der Mitte der logarithmischen Wuchphase. Nach einer geeigneten Expressionsphase (3-12 h) werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

### Beispiel 3

#### **IB Isolierung, Solubilisierung und Rückfaltung**

Puffer 1: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Puffer 2: 8M Harnstoff, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0

5 Puffer 3: 200 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 9 mM GSH,  
4 mM GSSG, 40 % (w/v) Glycerin, pH 8.0

(DDT: Dithiothreitol, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion)

#### **IB-Isolierung**

Das tns-AP-Fusionsprotein wird intrazellulär in zwei Formen gebildet: i) ein geringer  
10 Anteil (< 5 %) liegt als lösliches, biologisch aktives Enzym vor, dessen Aktivität mit der von  
Bretaudiere & Spillmann ((1984) Methods of Enzymatic Analysis, VCH, 75-82)  
beschriebenen Methode erfasst werden kann; ii) der weitaus größte Anteil wird in Form  
enzymatisch inaktiver IBs gebildet. Diese IBs müssen vor der Solubilisierung,  
Renaturierung, Reinigung und Modifikation des Proteins isoliert werden. Dazu werden die  
15 Zellen in Puffer 1 aufgenommen und mittels Hochdruckaufschluß aufgeschlossen. Die IBs  
werden danach durch mehrere Zentrifugations- und Waschschritten (in Puffer 1) isoliert.

#### **Solubilisierung**

Die Solubilisierung der IBs erfolgt unter ständigem Rühren für 2 Stunden bei  
Raumtemperatur in Puffer 2 mit 25 mg IBs (Feuchtgewicht) pro ml Puffer 2. Anschließend  
20 wird zur Herstellung eines klaren Solubilitäts nicht solubilisiertes Protein durch  
Zentrifugation entfernt.

#### **Rückfaltung**

Die Rückfaltung des Proteins erfolgt in Puffer 3. Dazu wird das klare Solubilisat mit einer  
Endkonzentration von 9,6 µg/ml (Proteinbestimmung nach Bradford, Analytical  
25 Biochemistry 72 (1976) 248-254) unter ständigem Rühren tropfenweise in Puffer 3

überführt. Dieser Vorgang (Pulsen) wird 12 mal im Abstand von 24 Stunden wiederholt. Die Bestimmung der Enzymaktivität im Rückfaltungsansatz erfolgt mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat nach der Methode von Breaudiere & Spillmann ((1984) Methods of Enzymatic Analysis, VCH, 75-82) jeweils 24 h nach Zugabe des klaren  
5 Solubilisats; das Ergebnis einer typischen Rückfaltungsreaktion ist in Fig. 5 dargestellt. Der Rückfaltungsansatz wird 24 Stunden nach der letzten Zugabe des klaren Solubilisats zur Entfernung nicht-löslicher Proteinaggregate zentrifugiert, die aktive tns-AP befindet sich danach im Überstand.

Beispiel 4

10 Reinigung und Dextranisierung des pelB-tns-AP-Fusionsgens

Puffer 4:      20 mM Tris-HCl, pH 8.0  
                  2 mM MgCl<sub>2</sub>  
                  0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
                  100 mM NaCl

15 Der die aktive tns-AP enthaltende Überstand aus Beispiel 3 wird zunächst per Ultrafiltration über eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa konzentriert. Um den Verlust von tns-AP durch unspezifische Bindung an die Membran zu vermeiden, kann diese zuvor für 24 h in einer 1% Rinderserumalbuminlösung inkubiert werden.

20 Anschließend wird der Ansatz in einer Durchflusselfodialyse für 24 h gegen Puffer 4 dialysiert. Die Leitfähigkeit des Dialysepuffers wird auf 13,2 mS/cm Leitfähigkeit eingestellt, die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 20 Liter Puffer 4/h. Die nach der Dialyse auftretenden Proteinaggregate werden durch Zentrifugation entfernt.

25 Das Dialysat wird nun durch eine wie oben bereits beschriebene Ultrafiltration auf ca. ein Zehntel des ursprünglichen Volumens konzentriert. Anschließend wird der Proteingehalt der Lösung und die Aktivität der tns-AP wie beschrieben ermittelt. Das derart vorbehandelte Protein kann dann durch Umsetzung mit Dextran chemisch modifiziert werden.

Dazu wird 1g Dextran T-40 (mittleres Molekulargewicht 40 kDa) in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und auf 4°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 200 mg CDAP-Bromid werden der Lösung 800 µl einer 0.6 M Triethanolamin-Lösung tropfenweise zugesetzt. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 8 eingestellt (Lösung 5).

- 5 Zur Dextransierung werden 1.5 mg tns-AP mit 300 µl Lösung 5 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird danach durch Zugabe von 12,5 µl einer 1 M Ethanolaminlösung abgestoppt und erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgt eine 24-stündige Dialyse gegen Puffer 4. Der Erfolg der Dextransierung wird gelchromatographisch an einer TSKG 5000 PWXL-Säule (Tosohhaas) mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8.0 als Laufpuffer überprüft; ein typisches Elutionsprofil der tns-AP vor und nach der Dextransierung zeigt Fig. 6. Die enzymatische Aktivität der tns-AP beträgt nach der Dextransierung ca. 70-90 % der Aktivität vor der Dextransierung.
- 10
- 15

In analoger Weise wird tns-AP an Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von 40 kDa, 60 kDa, 188 kDa und 400 kDa gekoppelt.

#### Beispiel 5

#### Bewertung der dextransierten tns-AP im klinischen Aktivitätstest

- Die Bewertung des rückgefaltenen, dextransierten Proteins auf seine Eignung als Referenzenzym erfolgt in Form eines Methodenvergleiches in zwei von der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) publizierten Puffersystemen (Tiez et al. (1983) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21: 731-748). Dieser Test wird mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bei 37°C durchgeführt. Im Rahmen dieses Methodenvergleiches liegt die Aktivitätskurve eines humanen Serums exakt auf der winkelhalbierenden Gerade des x/y-Diagramms (Abszisse: Aktivität in 350 mM AMP, pH 20 10.5; Ordinate 900 mM AMP, pH 10.44), d.h. das im Serum enthaltende AP-Gemisch besitzt in beiden Puffersystemen eine identische enzymatisch-spezifische Aktivität. Ein geeignetes Referenzenzym sollte die idealerweise die gleichen Eigenschaften aufweisen.
- 20
- 25

Zur Bewertung wird die Aktivität der tns-AP aus Beispiel 4 mit der Aktivität eines Humanserums, der tns-AP aus Beispiel 3 sowie mit einem kommerziellen Kontrollserum (Cfas, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) im beschriebenen Methodenvergleich getestet; die Auswertung erfolgt auf einem Roche/Hitachi-Analyzer

5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Typische Bewertungsprofile sind in Figur 7 und 8 wiedergegeben: Das Aktivitätsprofil der dextranisierten tns-AP ist deckungsgleich mit dem des humanen Serums und liegt auf der winkelhalbierenden Gerade des x/y-Diagramms, d.h. beide Proben weisen in beiden Puffern die gleiche Aktivität auf. Somit erfüllt die dextranisierte tns-AP die Anforderungen an ein ideales Kontrollenzym.

10 Dabei hat das Molekulargewicht des verwendeten Dextrans offensichtlich kein Einfluß auf das Aktivitätsprofil. Dagegen liegen sowohl die nicht-dextranisierte als auch das kommerzielle Kontrollserum unterhalb der winkelhalbierenden Gerade, was nicht den Anforderungen an einen idealen Kallibrator entspricht (Figur 9).

Referenzliste

Andersson, A., et al., Int J Cancer 47 (1991) 439-44  
Balbas, P., Mol Biotechnol 19 (2001) 251-67  
Fukushi, M., et al., Biochem Biophys Res Commun 246 (1998) 613-8  
5 Harris, H., Clin Chim Acta 186 (1990) 133-50  
Hooper, N. M., Clin Chim Acta 266 (1997) 3-12  
Holmberg, A. and Meurling, L., Bioconjug Chem 4 (1993) 570-3  
Lilie, H., et al., Curr Opin Biotechnol 9 (1998) 497-501  
Lovqvist, A., et al., Cancer Biother 8 (1993) 345-56  
10 Makrides, S. C., Microbiol Rev 60 (1996) 512-38  
Maldonado, O., et al., J Clin Gastroenterol 27 (1998) 342-5  
Miura, M., et al., Ann Clin Biochem 31 (1994) 25-30  
Moss, D. W., Clin Chem 38 (1992) 2486-92  
Mulivor, R. A., et al., J Lab Clin Med 105 (1985) 342-8  
15 Nosjean, O., et al., Biochem J 321 (1997) 297-303  
Oda, K., et al., J Biochem (Tokyo) 126 (1999) 694-9  
Olsson, P., et al., Int J Cancer 56 (1994) 529-37  
Romagnoli, E., et al., Clin Chem Lab Med 36 (1998) 163-8  
Sambrook, J., et al., in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Eds. J.  
20 Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory  
Press, Cold Spring Harbour, NY  
Silve, C., Curr Opin Rheumatol 6 (1994) 336-9  
Sjostrom, A., et al., Int J Cancer 70 (1997) 383-9  
Tietz, N. W., et al., J Clin Chem Clin Biochem 21 (1983) 731-48  
25 Weiss, M. J., et al., J Biol Chem 263 (1988) 12002-10  
Weiss, M. J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986) 7182-6  
Wiwanitkit, V., BMC Fam Pract 2 (2001) 2

US 5,434,067



Patentansprüche

EPO - Munich  
67  
22 Juli 2002

1. Konjugat einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) und Dextran erhältlich durch Reaktion von unglykolyserter tns-AP mit aktiviertem Dextran in wässriger Lösung, Abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung.  
5
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als unglycosylierte tns-AP eine tns-AP verwendet wird, die durch rekombinante Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer prokaryonischen Zelle erhalten wurde.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Dextran eines mittleren Molekulargewichts von 10 – 500 kDa verwendet wird.  
10
4. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates durch Reaktion von unglykolyserter tns-AP mit aktiviertem Dextran durch Inkubation in wässriger Lösung, abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung.
5. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, dass als unglycosylierte tns-AP eine tns-AP verwendet wird, die durch rekombinante Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer prokaryonischen Zelle erhalten wurde.  
15
6. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein Dextran eines mittleren Molekulargewichts von 10 – 500 kDa verwendet wird.  
20
7. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach den Ansprüchen 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Dextran mit CDAP oder BrCN aktiviert wird.
8. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach den Ansprüchen 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass für die genannte Reaktion unglycosylierte tns-AP und aktiviertes Dextran im Verhältnis 1:2 bis 1:500 eingesetzt werden.  
25
9. Verwendung eines Konjugates gemäß den Ansprüchen 1 – 3 als Standard in einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

10. Verwendung einer unglycosylierten tns-AP zur Herstellung eines Konjugates unglycosylierter tns-AP und Dextran.

EPO - Munich  
67  
22 Juli 2002

Zusammenfassung

Ein Konjugat einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) und Dextran erhältlich durch Reaktion von unglykolyseierter tns-AP mit aktiviertem Dextran durch Inkubation in wässriger Lösung abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus 5 der Lösung ist als Standard zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase geeignet.



EPO - Munich  
67  
22 July 2002

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG  
5  
<120> Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen  
Phosphatase und Dextran, Verfahren zur Herstellung und  
Verwendung  
10 <130> 21323 EP  
  
<140>  
<141>  
15 <160> 18  
  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
  
<210> 1  
20 <211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
25 <223> Description of Artificial Sequence:primer apNup  
  
<400> 1  
cacagaattc tgcatactctg ggctccaggg ataaaggcagg tc 42  
30  
<210> 2  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
35  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer apCdw  
  
<400> 2  
40 tctggatccg ggccctcaga acaggacgct c 31  
  
<210> 3  
<211> 1637  
45 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<223> hutns-AP, pcr-product  
50  
<400> 3  
gaattctgca tctctggct ccagggataa agcaggtctt ggggtgcacc atgatttcac 60  
cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaactc ctttagtgcca gagaaagaga 120  
aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc ctggagcttc 180  
55 agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatacatgtt cctggagat gggatgggtg 240

tctccacagt gacggctgcc cgcatccta agggtcagct ccaccacaac cctggggagg 300  
agaccaggct ggagatggac aagtcccct tcgtggccct ctccaagacg tacaacacca 360  
atgcccagggt ccctgacagc gccggcaccc ccaccgccta cctgtgtggg gtgaaggcca 420  
atgagggcac cgtggggta agcgcagcca ctgagcgttc cccgtgcaac accaccagg 480  
5 ggaacgaggt cacctccatc ctgcgctggg ccaaggacgc tggaaatct gtggcattt 540  
tgaccaccac gagagtgaac catgccaccc ccagcgccgc ctacgcccac tcggctgacc 600  
gggactggta ctcagacaac gagatcccc ctgaggcctt gagccaggc tgtaaggaca 660  
tcgcctacca gtcatgcac aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg ggtggccgga 720  
aatacatgta ccccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgacgag aaagccagg 780  
10 gcacgaggct ggacggcctg gacctcggtt acacctggaa gagctcaaa ccgagacaca 840  
agcaactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac cttgacccc cacaatgtgg 900  
actacctatt gggtctcttc gagccggggg acatgcagta cgagctgaac aggaacaacg 960  
tgacggaccc gtcactctcc gagatgggtt tggggccat ccagatcctg cggaagaacc 020  
ccaaaggctt cttcttgctg gtggaaaggag gcagaattga ccacggcac catgaaggaa 080  
15 aagccaagca ggcctgcat gaggcggtgg agatggacgg ggcgtcggtgg caggcaggca 140  
gcttgacctc ctcggaaagac actctgaccg tggtcactgc ggaccattcc cacgtcttca 1200  
catttggtgg atacaccccc cgtggcaact ctatcttgg tctggcccccc atgctgagtg 1260  
acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tttatggcaa tgggctggc tacaagggtgg 1320  
tggcggtga acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac taccaggcgc 1380  
20 agtctgctgt gcccctgcgc cacgagaccc acggcggggg ggacgtggcc gtcttcttca 1440  
agggccccat ggcgcacctg ctgcacggcg tccacgagca gaactacgac ccccacgtg 1500  
tggcgatgc agcctgcatc gggccaaacc tcggccactg tgctctgccc agctcggcag 1560  
gcagccttgc tgcaggcccc ctgctgctcg cgctggccct ctacccttg agcgtcctgt 1620  
tctgaggggcc cggatcc 1637

25

<210> 4  
<211> 524

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<223> hutns-AP, protein

35 <400> 4

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn  
1 5 10 15

40 Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln  
20 25 30

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr  
35 40 45

45 Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val  
50 55 60

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn  
65 70 75 80

50 Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala  
85 90 95

55 Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly  
100 105 110

Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala Asn Glu Gly Thr Val  
115 120 125

5 Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys Asn Thr Thr Gln Gly  
130 135 140

Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys Asp Ala Gly Lys Ser  
145 150 155 160

10 Val Gly Ile Val Thr Thr Arg Val Asn His Ala Thr Pro Ser Ala  
165 170 175

Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Asn Glu Met  
180 185 190

15 Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp Ile Ala Tyr Gln Leu  
195 200 205

Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met Gly Gly Gly Arg Lys  
210 215 220

Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu Tyr Glu Ser Asp Glu  
225 230 235 240

25 Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp Leu Val Asp Thr Trp  
245 250 255

Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His Phe Ile Trp Asn Arg  
260 265 270

30 Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val Asp Tyr Leu Leu Gly  
275 280 285

Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu Asn Arg Asn Asn Val  
290 295 300

35 Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val Ala Ile Gln Ile Leu  
305 310 315 320

40 Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val Glu Gly Gly Arg Ile  
325 330 335

Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln Ala Leu His Glu Ala  
340 345 350

45 Val Glu Met Asp Arg Ala Val Gly Gln Ala Gly Ser Leu Thr Ser Ser  
355 360 365

Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Thr  
50 370 375 380

Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro  
385 390 395 400

55 Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr Ala Ile Leu Tyr Gly  
405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser  
420 425 430

5 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro  
435 440 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys  
450 455 460

10 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val  
465 470 475 480

Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His  
15 485 490 495

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu  
500 505 510

20 Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe  
515 520

25 <210> 5  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

30 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN1\_up

35 <400> 5  
atccgaagta ctggcgagac caagcgcaag agacactgaa atatgccctg gagcttcaga 60  
agctcaacac caacgtggct 80

40 <210> 6  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

45 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN2\_up

50 <400> 6  
ccacagtgcac ggctgcccgc atcctcaagg gtcagctcca ccacaaccct ggggaggaga 60  
ccaggctgga gatggacaag 80

55 <210> 7  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

55 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN3\_up

5           <400> 7  
cccaggtccc tgacagcgcc ggcaccggca cgcctacct gtgtgggtg aaggccaatg 60  
      agggcaccgt ggggtaagc   80

10          <210> 8  
<211> 80  
<212> DNA  
10          <213> Artificial Sequence

15          <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN1\_dw

15          <400> 8  
gcgggcagcc gtcactgtgg agacacccat cccatctccc aggaacatga tgacattttt 60  
      agccacgttg gtgtttagt   80

20          <210> 9  
<211> 80  
<212> DNA  
20          <213> Artificial Sequence

25          <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN2\_dw

25          <400> 9  
ggcgctgtca gggacctggg cattgggtttt gtacgtcttg gagagggcca cgaagggaa 60  
30        cttgtccatc tccagcctgg                                   80

35          <210> 10  
<211> 80  
35          <212> DNA  
35          <213> Artificial Sequence

40          <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:APN3\_dw

40          <400> 10  
caggatggag gtgacacctgt tccccctgggt ggtgttgcac cgggaacgct cagtggctgc 60  
      gcttacccccc acggtgccct                                   80

45          <210> 11  
<211> 80  
<212> DNA  
45          <213> Artificial Sequence

50          <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer uppel

55          <400> 11  
cacacagaat tcattaaaga ggagaaatataat atctgctgcc aactgctgca 60  
      gctggctgc tgctcctggc                                   80

<210> 12  
<211> 81  
5 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer dwpel  
10 <400> 12  
gtctcgccag tacttcggat cttttcttt ttctggaacc agtgccatag ccggctgagc 60  
agccaggagc agcagaccag c 81  
  
15 <210> 13  
<211> 501  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
20 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:pelB-AP\_N  
  
<400> 13  
25 cacacagaat tcattaaaga ggagaaatta actatgaaat atctgctgcc aactgctgca 60  
gctggtctgc tgctcctggc tgctcagccg gctatggcac tggttccaga aaaagaaaaa 120  
gatccgaagt actggcgaga ccaagcgcaa gagacactga aatatgccct ggagcttcag 180  
aagctcaaca ccaacgtggc taagaatgtc atcatgttcc tgggagatgg gatgggtgtc 240  
30 tecacagtga cggctgccc ccatcctaag ggtcagctcc accacaaccc tggggaggag 300  
accaggctgg agatggacaa gttcccttc gtggccctct ccaagacgta caacaccaat 360  
gccccagggtcc ctgacagcgc cggcaccgccc accgcctacc tgtgtggggta 420  
gagggcaccc tggggtaag cgcagccact gagcgttccc ggtgcaacac caccagggg 480  
aacgaggtca cctccatcct g 501  
  
35 <210> 14  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
40 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer  
mhuapQEup  
  
45 <400> 14  
atatagaatt cttagtgcca gagaaagaga aagaccccaa g 41  
  
50 <210> 15  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
55 <223> Description of Artificial Sequence:primer  
mhuapQEdw

<400> 15  
atctggatcc ttactaagat ctgcctgccg agctggcagg agcacag 47

5           <210> 16  
<211> 1539  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

10          <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Fusionsgen  
pelB-tns-AP-deltaGPI

15          <400> 16  
atgaaaatatac tgctgccaac tgctgcagct ggtctgctgc tcctggctgc tcagccggct 60  
atggcactgg ttccagaaaa agaaaaaagat ccgaagtact ggccgagacca agcgcatagag 120  
acactgaaat atgccttggc gcttcagaag cttcaacacca acgtggctaa gaatgtcattc 180  
atgttccctgg gagatgggat gggtgtctcc acagtgcacgg ctgcggcat cctcaagggt 240  
20          cagctccacc acaaccctgg ggaggagacc aggctggaga tggacaagtt ccccttcgtg 300  
gccctctcca agacgtacaa caccatgcc caggtccctg acagcggcgg cacccgcccacc 360  
gccttacctgt gtggggtgaa gccaatagtag ggcaccgtgg gggtaagcgc agccacttag 420  
cgttcccggt gcaacaccac ccaggggaaac gaggtcacct ccattctgcg ctgggccaag 480  
gacgctggga aatctgtggg cattgtgacc accacgagag tgaaccatgc caccggcacc 540  
25          gccgcctacg cccactcgcc tgaccgggac tggtaacttag acaacgagat gcccccttag 600  
gccttggcc agggctgtaa ggacatcgcc taccagctca tgcataacat cagggacatt 660  
gacgtgatca tgggggtgg ccggaaatac atgtacccca agaataaaaac tggatgtggag 720  
tatgagagtg acgagaaaagc caggggcacg aggctggacg gcctggacct cggtgacacc 780  
tggaagagct tcaaaccggc acacaaggac tcccacttca tctggAACCG 840  
30          ctgacccttg acccccacaa tggactac ctattgggtc tcttcggagcc gggggacatg 900  
cagtagcggc tgaacaggaa caacgtgacg gaccgtcac tctccggagat ggtgggtgg 960  
gccatccaga tcctgcggaa gaaccccaaa ggcttcttct tgctgggtgg 1020  
attgaccacg ggcaccatga aggaaaaagcc aaggcaggccc tgcattggc ggtggagatg 1080  
gaccgggccc tcgggcaggc aggtagctg acctcctcg aagacactct gaccgtggc 1140  
35          actgcggacc attcccacgt cttcacattt ggtggataca ccccccgtgg caactctatc 1200  
tttggctctgg ccccccattgt ggtggacaca gacaagaagg ctttactgc catcctgttat 1260  
ggcaatgggc ctgggtacaa ggtgggtggc ggtgaacggag agaatgtctc catgggtggac 1320  
tatgctcaca acaactacca ggcgcagttt gctgtgcccc tgcgccacga gaccacggc 1380  
ggggaggacg tggccgtctt ctccaaggggc cccatggcgc acctgctgca cggcgacac 1440  
40          gagcagaact acgtccccca cgtgtatggcg tatgcagccct gcatggggc caacctcggc 1500  
cactgtgtc ctggccagctc ggcaggcaga tcttagtaa 1539

45          <210> 17  
<211> 511  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

50          <220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Protein  
pelB-tns-AP-deltaGPI

<400> 17  
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
55          1                         5                         10                         15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys  
20 25 30

5 Tyr Trp Arg Asp Gln Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu  
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Thr Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly  
50 55 60

10 Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly  
65 70 75 80

Gln Leu His His Asn Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys  
15 85 90 95

Phe Pro Phe Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val  
100 105 110

20 Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Ala  
115 120 125

Asn Glu Gly Thr Val Gly Val Ser Ala Ala Thr Glu Arg Ser Arg Cys  
130 135 140

25 Asn Thr Thr Gln Gly Asn Glu Val Thr Ser Ile Leu Arg Trp Ala Lys  
145 150 155 160

Asp Ala Gly Lys Ser Val Gly Ile Val Thr Thr Thr Arg Val Asn His  
30 165 170 175

Ala Thr Pro Ser Ala Ala Tyr Ala His Ser Ala Asp Arg Asp Trp Tyr  
180 185 190

35 Ser Asp Asn Glu Met Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gln Gly Cys Lys Asp  
195 200 205

Ile Ala Tyr Gln Leu Met His Asn Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Met  
210 215 220

40 Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Tyr Pro Lys Asn Lys Thr Asp Val Glu  
225 230 235 240

Tyr Glu Ser Asp Glu Lys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Asp Gly Leu Asp  
45 245 250 255

Leu Val Asp Thr Trp Lys Ser Phe Lys Pro Arg His Lys His Ser His  
260 265 270

50 Phe Ile Trp Asn Arg Thr Glu Leu Leu Thr Leu Asp Pro His Asn Val  
275 280 285

Asp Tyr Leu Leu Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Gln Tyr Glu Leu  
290 295 300

55 Asn Arg Asn Asn Val Thr Asp Pro Ser Leu Ser Glu Met Val Val Val  
305 310 315 320

Ala Ile Gln Ile Leu Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val  
325 330 335

5 Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln  
340 345 350

Ala Leu His Glu Ala Val Glu Met Asp Arg Ala Val Gly Gln Ala Gly  
355 360 365

10 Ser Leu Thr Ser Ser Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His  
370 375 380

Ser His Val Phe Thr Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile  
15 385 390 395 400

Phe Gly Leu Ala Pro Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr  
405 410 415

20 Ala Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu  
420 425 430

Arg Glu Asn Val Ser Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala  
435 440 445

25 Gln Ser Ala Val Pro Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val  
450 455 460

Ala Val Phe Ser Lys Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His  
30 465 470 475 480

Glu Gln Asn Tyr Val Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly  
485 490 495

35 Ala Asn Leu Gly His Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Arg Ser  
500 505 510

40 <210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

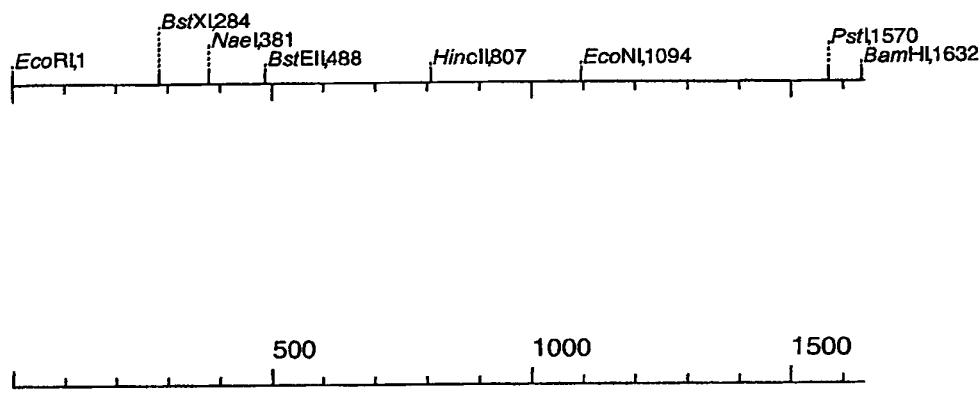
45 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide

<400> 18  
agatcttag aaggatccag at



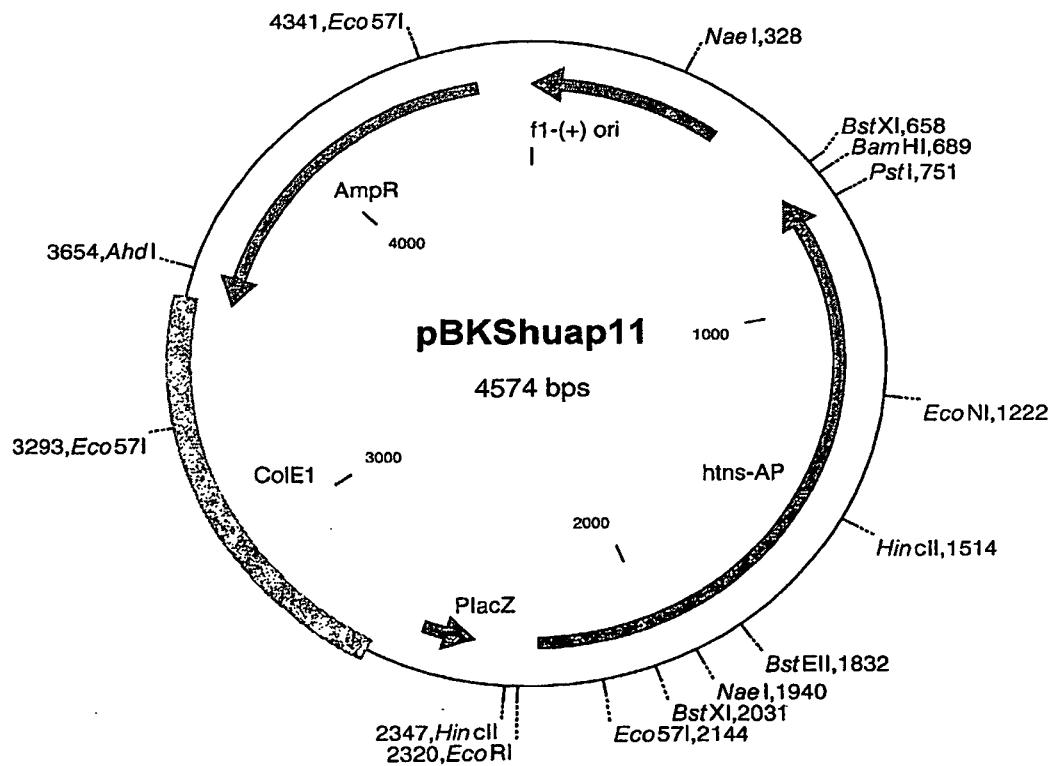
EPO - Munich  
67  
22 Juli 2002

Fig. 1

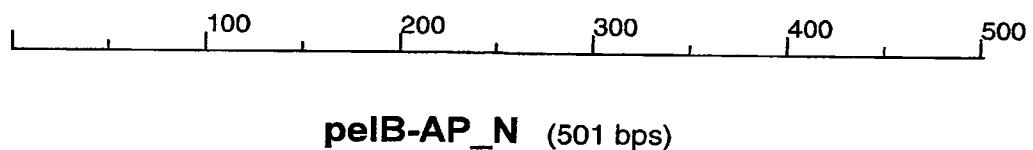
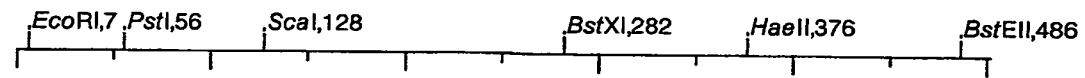


PCR htns\_AP (1637 bps)

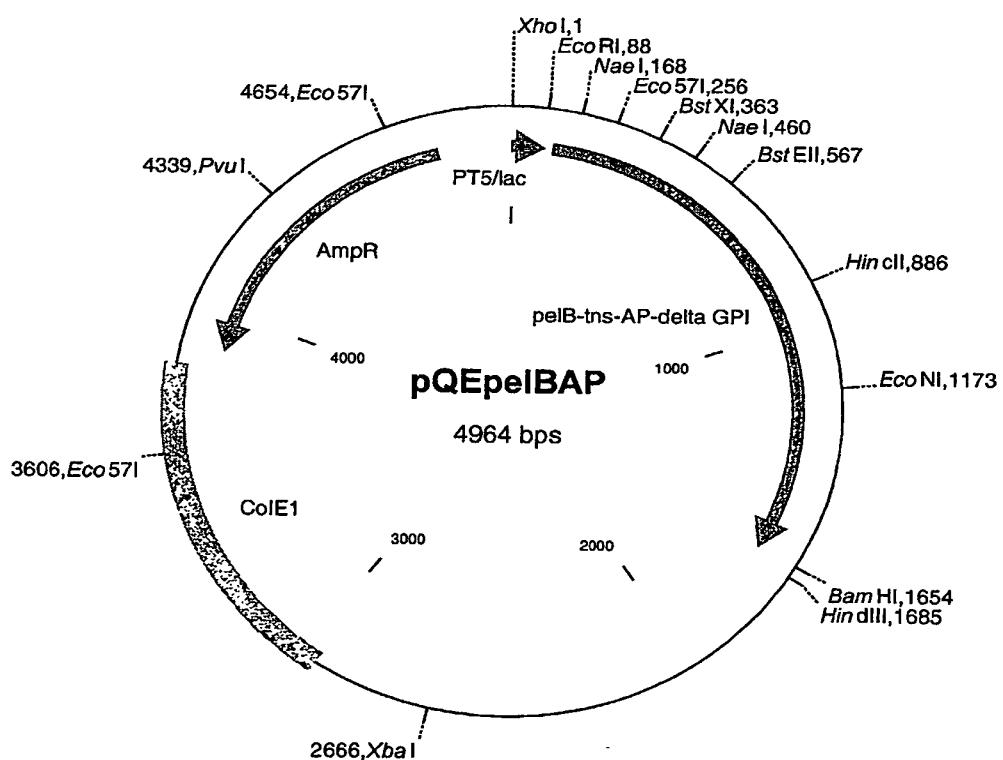
Fig. 2



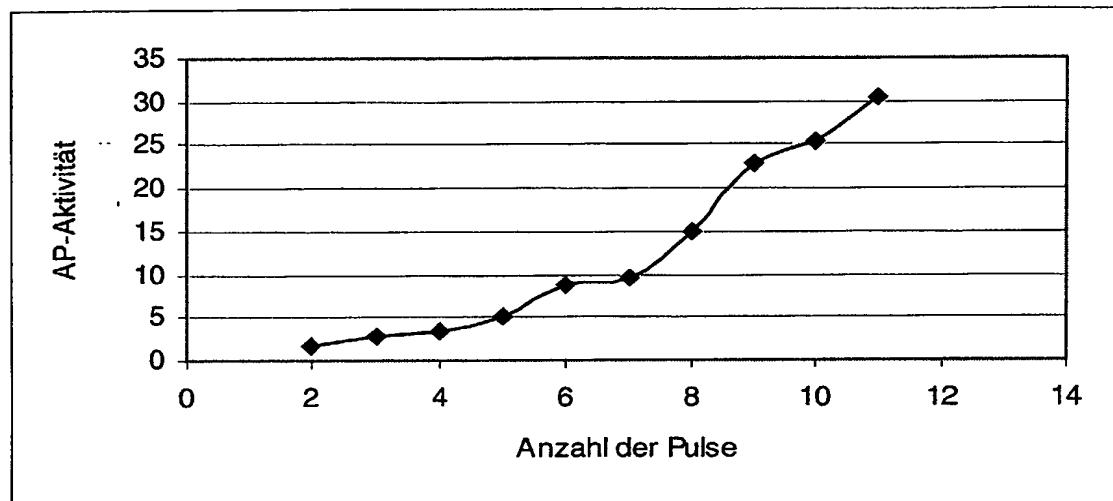
**Fig. 3**



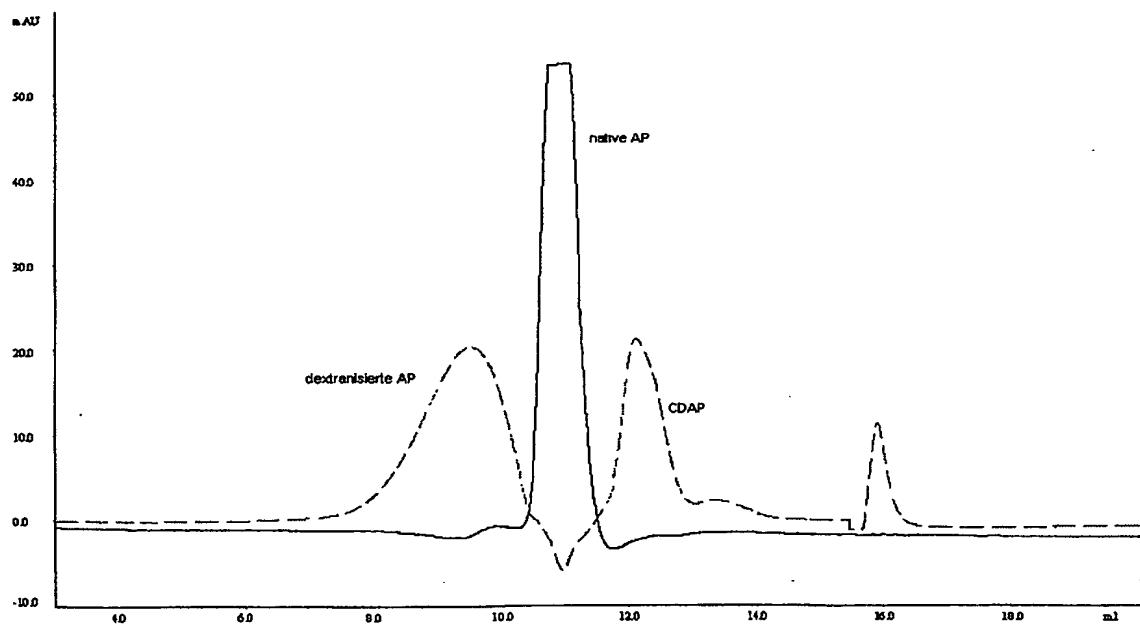
**Fig. 4**



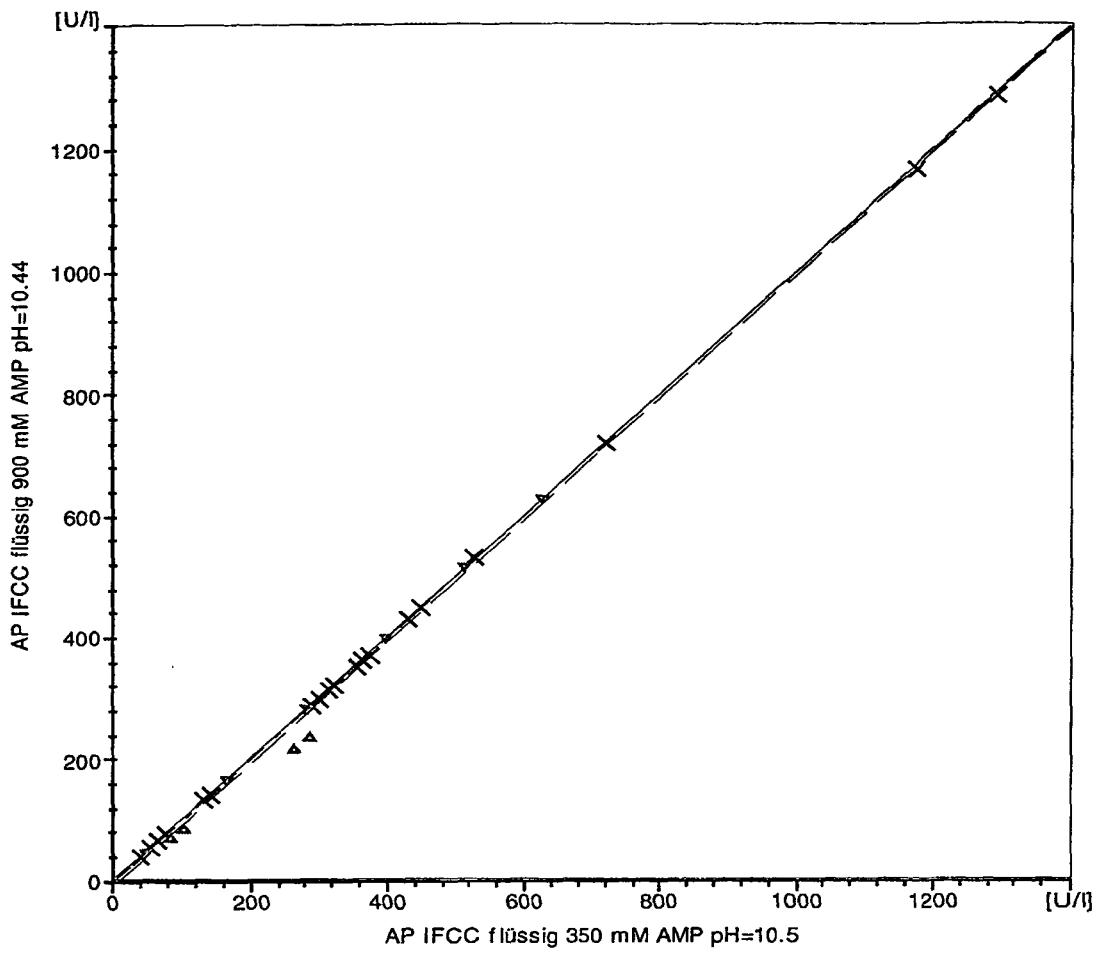
**Fig. 5**



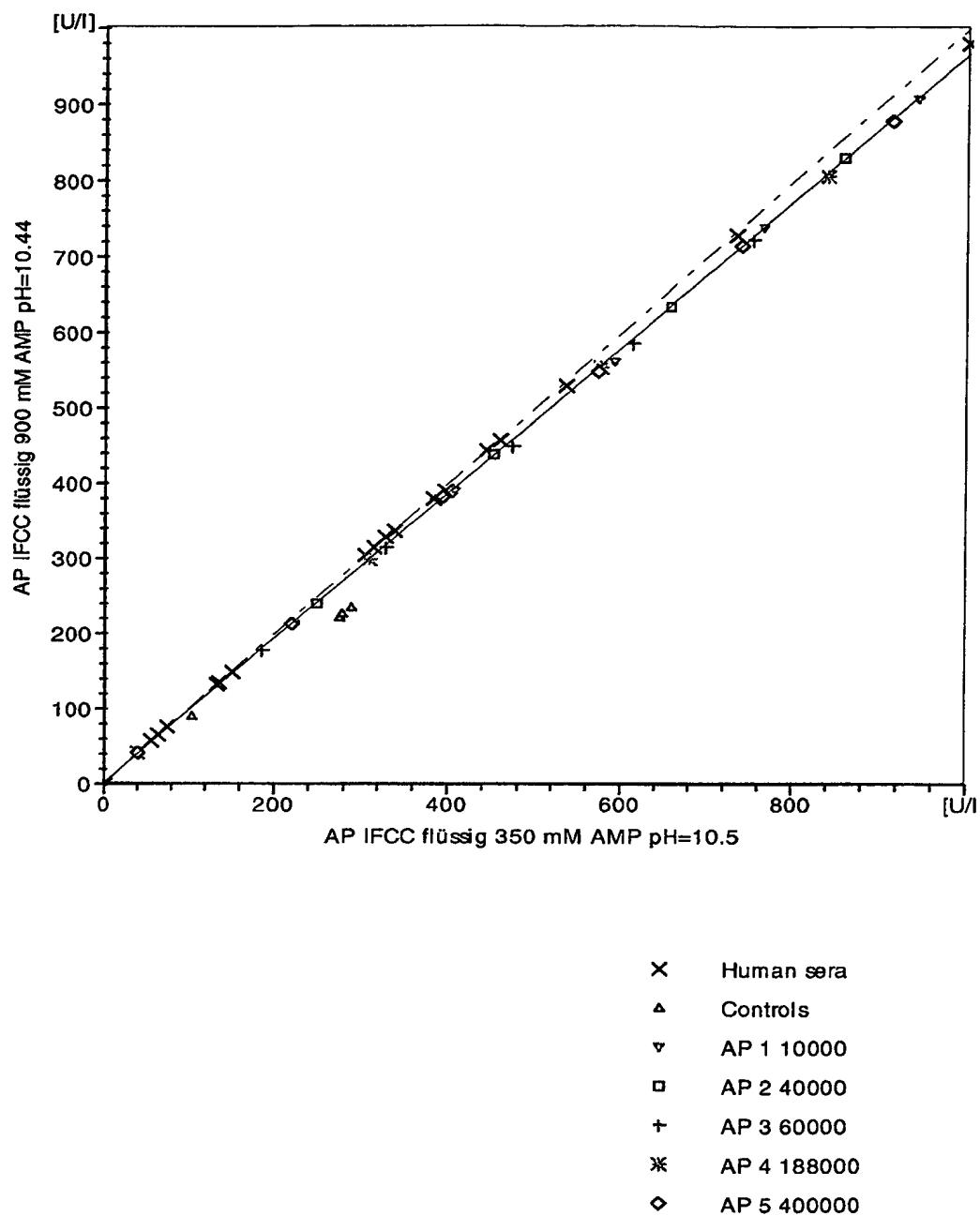
**Fig. 6**



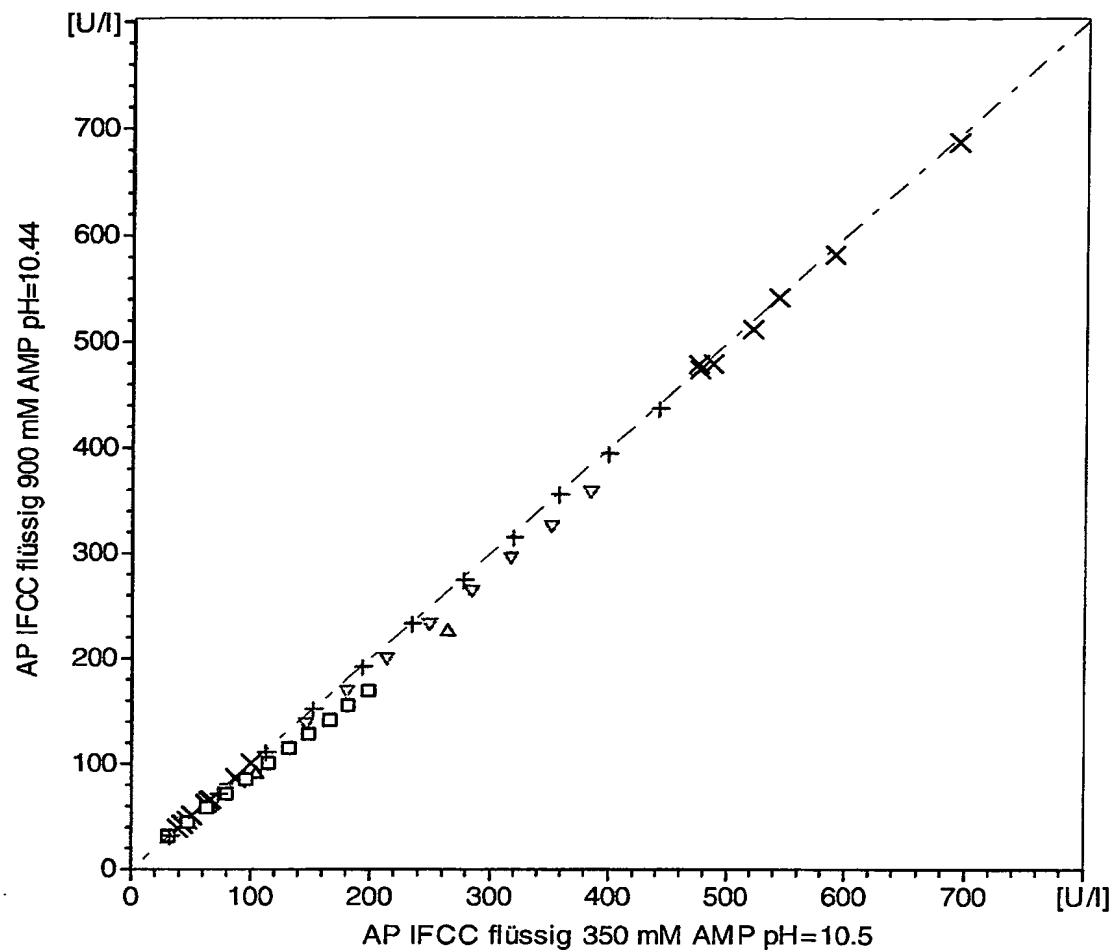
**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



- X Normalseren
- Δ PNU, PPU
- ▽ b-APA3 nativ
- b-APA3 glucosidiert
- + b-APA3 dextranisiert